

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. O. P. Hornstein

**Autoradiographische Untersuchungen
über die DNS-Synthese in der Wangenschleimhaut
der erwachsenen männlichen Ratte**

**Der Einfluß von circadianen Schwankungen des ^3H -Indexes
und des Mitoseindexes auf die Bestimmung von Teilphasen
des Generationszyklus *)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem

Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Hans-Jürgen Zeißler

aus Ebermannstadt

D 29

*) Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

1976

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. O. P. Hornstein

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 1976

Untersuchungen über die Dauer der DNS-Synthesephase in der Wangenschleimhaut der männlichen Ratte*

I. Vergleich von zwei autoradiographischen Methoden in vivo

G. H. Schmid, H. Schell, O. P. Hornstein, H. U. Meisel und H. J. Zeissler

Dermatologische Universitätsklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. O. P. Hornstein)

Eingegangen am 27. Juni 1974

Studies on the Duration of the Nuclear DNA Synthesis in the Buccal Mucosa of Adult Male Rats

I. Comparative Evaluation of Two Autoradiographic Methods in vivo

Summary. In 46 adult male Sprague Dawley rats the duration of the nuclear DNA synthesis of the buccal mucosa epithelium was investigated by the technique of %-labelled mitoses and by double-labelling with ^3H -thymidine. By the former method the length of the S-phase (T_s) was calculated as ranging from 7.5 to 8 hrs and, by the latter method, from 7.65 to 10 hrs.

The wider variation of the data obtained by the double-labelling technique proved to be due to some difficulties in the method. Apparently, the duration of the S-phase in the buccal epithelium of the rats investigated varies to some degree as the frequency distributions of major:minor silver grain density obtained by a high and a low dose of ^3H -thymidine overlap each other in a narrow range. As this overlap of nuclear labelling by two distinct doses of ^3H -thymidine gives rise to some difficulties in the exact determination of the virtual ratio of two groups of nuclei labelled at different times, the real ratio of both nuclear groups revealed by count was corrected mathematically.

As the curve of %-labelled mitoses is influenced by the circadian rhythm of the mitosis index the percentage of mitoses counted in follow-up of the experiment cannot be determined with a constant degree of reliability. Nevertheless, in our studies on the duration of the DNA synthesis in the buccal mucosa epithelium of the rat the method of %-labelled mitoses was proved to give more conclusive results than that of double-labelling by ^3H -thymidine.

Zusammenfassung. Bei 46 erwachsenen männlichen Ratten wurde im Epithel der Wangenschleimhaut die Dauer der DNS-Verdopplungsphase mit Hilfe des %-markierte Mitosen-Verfahrens und der Doppelmarkierung mit ^3H -Thyminid ermittelt, wobei die methodischen Probleme beider Bestimmungen miteinander verglichen wurden. Mit dem %-markierte Mitosen-Verfahren ergaben sich Werte von 7,5—8 Std, bei der ^3H -Thyminid-Doppelmarkierung divergierten die errechneten Werte zwischen 7,65 und 10 Std.

Die größere Streuung der bei der Doppelmarkierung erhaltenen Einzelwerte beruht auf verschiedenen methodischen Schwierigkeiten. Anscheinend schwankt im Wangenepithel erwachsener Ratten die Länge der S-Phase um einen Mittelwert, so daß sich schwache und starke Kernmarkierungen in einem schmalen Markierungsbereich überschneiden. Dadurch wird es schwierig, die genaue Relation zwischen den von der hohen und den allein von der niedrigen Dosis getroffenen Kernen zu ermitteln.

Bei der %-markierte Mitosen-Kurve wirken sich die tageszyklischen Schwankungen in der Höhe des Mitose-Indexes in der Weise aus, daß für die im zeitlichen Ablauf des Experimentes ermittelten Werte die statistische Sicherheit nicht gleichbleibend ist. Nach unseren Ergebnissen erscheint jedoch das %-markierte Mitosen-Verfahren besser als die ^3H -Thyminid-Doppelmar-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 119

kierung zur Bestimmung der S-Phasenlänge im buccalen Schleimhautepithel der erwachsenen Ratte geeignet.

Ausgehend von früheren proliferationskinetischen Studien über die Wangenschleimhaut der männlichen Ratte (Schmid *et al.*, 1973; Schell und Schmid, 1973; Schell *et al.*, 1974) untersuchten wir im gleichen Gewebe die S-Phasenlänge *in vivo*. Dabei stellten wir das Prozent-markierte-Mitosen-Verfahren (Quastler und Sherman, 1959) dem Doppelmarkierungsverfahren mit ^3H -Thymidin (Wegener *et al.* 1964) gegenüber. Besonderes Augenmerk richteten wir auf methodische Probleme, da die Frage der Anwendbarkeit der DNS-Doppelmarkierung für die Bestimmung der S-Phasenlänge *in vivo* auch für entsprechende Untersuchungen *in vitro* von prinzipieller Bedeutung ist.

Material und Methode

Es kamen 46 männliche Sprague-Dawley-Ratten einer Zucht in den Versuch. Die Tiere waren 4 Monate alt, wogen durchschnittlich 380 g und unterlagen einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus (8–20 Uhr hell, 20–8 Uhr dunkel). Sie erhielten Altromin®-Hartfutter und Wasser *ad lib.* und wurden zu fünf in einem Käfig gehalten; die Eingewöhnungszeit betrug 30 Tage.

Gruppe I. 36 Ratten erhielten gegen 9 Uhr vormittags je 500 μC ^3H -Thymidin (Schwarz-Mann Bio Research, New York; spez. Akt. 6 C/mMol) i. p. appliziert und wurden paarweise nach verschiedenen langen radioaktiven Versuchszeiten getötet (nach 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 18; 20; 24; 28 Std).

Gruppe II a. 8 Ratten erhielten gegen 9 Uhr vormittags 4 verschiedene Dosen von ^3H -Thymidin (je 2 Tiere 50 μC , 100 μC , 500 μC und 1000 μC ; spez. Akt. s.o.) i.p. appliziert und wurden 1 Std später getötet.

Gruppe II b. 2 Ratten bekamen um 9 Uhr vormittags je 50 μC ^3H -Thymidin (spez. Akt. s.o.) und nach 60 min eine 2. Dosis mit 500 μC ; die Tötung erfolgte 30 min nach der letzten Injektion.

Alle Tiere wurden im Ätherrausch durch Dekapitation getötet. Nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung wurden von der Wangenschleimhaut 3 μ dicke Schnitte angefertigt, mit dem Stripping-Film AR 10 (Kodak) 18 Tage lang autoradiographisch exponiert und nach dem Entwickeln und Fixieren mit Haematoxylin-Eosin gefärbt.

Auswertung der Autoradiogramme

Als markiert definierten wir — zur sicheren Abgrenzung vom sog. Nulleffekt — nur Zellkerne mit mindestens 4 Silberkörnern.

Aufstellung der %-markierte-Mitosen-Kurve. Dazu wurden die 36 Ratten der Gruppe I ausgewertet, indem an durchschnittlich 100 Metaphasenkernen/Tier der Prozentsatz markierter Mitosen bestimmt wurde.

Zur Ermittlung der S-Phasenlänge ($=T_s$) mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung gilt die Beziehung:

$$T_s = \frac{y \cdot \Delta t}{x}$$

Dabei ist y die Zahl der von der hohen Dosis des ^3H -Thymidins markierten Zellkerne und x die Zahl der allein von der niedrigen Dosis getroffenen Zellkerne, die während Δt die S-Phase beendet hatten.

Voraussetzung ist, daß die verwendeten Dosisbereiche alle in der DNS-Synthese befindlichen Zellkerne des Stratum basale markieren. Daher prüften wir an der Tiergruppe II a die Abhängigkeit des ^3H -Indexes von der verabreichten Dosis des ^3H -Thymidins, indem wir an 2000 Zellkernen/Tier den ^3H -Index bestimmten.

Um die unterschiedlich starke Kernmarkierung einem der beiden verwendeten Dosisbereiche zuordnen zu können, muß im ARG die Grenze zwischen schwacher und starker Markierung definiert werden. Hierzu wurde an 4 Ratten der Gruppe II a, die paarweise 50 μC bzw. 500 μC ^3H -Thymidini p. erhalten hatten und 1 Std später getötet wurden, pro Tier an 200 im histologischen Schnitt aufeinanderfolgenden Zellkernen die Anzahl der Silberkörner/Zellkern ausgezählt (= SK/ZK). Die Häufigkeitsverteilungen der SK/ZK beider Dosisbereiche wurden unter Zusammenfassung von Fünfer-Gruppen miteinander verglichen. Dabei konnte der größte Teil der markierten Zellkerne einer bestimmten Dosis des ^3H -Thymidins sicher zugeordnet werden, in einem kleinen Bereich kam es aber zu einer Überschneidung der Markierungen (Abb. 2). Bei der Definition der Grenze zwischen schwacher und starker Kernmarkierung wurde dieser Überschneidungsbereich halbiert, so daß ebenso viele durch die niedrige Erstdosis stark wie durch die hohe Zweitdosis schwach markierte Zellkerne resultierten.

Zur Auswertung der doppelt markierten ARG der Tiergruppe II b wurde die Grenze zwischen starker und schwacher Kernmarkierung aus dem Vorversuch übernommen und an mindestens 1000 markierten Kernen/Ratte das Verhältnis der stark zu den schwach markierten Kernen ermittelt. Dieses Zahlenverhältnis entspricht aber nicht $y : x$, denn ein kleiner Teil der durch die hohe Dosis getroffenen Kerne trägt nur eine schwache Markierung; umgekehrt werden auch bei der niedrigen Dosis einige Kerne stark markiert. Das genaue Zahlenverhältnis von $y : x$ wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Vorversuch zur Grenzziehung zwischen den Markierungsintensitäten errechnet¹.

Ergebnisse

Der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes markierter Mitosen nach einmaliger Applikation von ^3H -Thymidin ist in Abb. 1 dargestellt: Erste markierte Mitosen werden nach 1 Stunde radioaktiver Versuchszeit beobachtet, es kommt relativ schnell zu einem deutlichen Anstieg der Kurve, nach 4 Std ist der 100%-Wert erreicht. Zwischen der 6. und 10. Stunde nach Versuchsbeginn sinkt die Kurve wieder ab und erreicht nach 14 Std den Nullwert. Verglichen mit dem durch die Einzelergebnisse gut definierten Anstieg der Kurve ist ihr absteigender Schenkel durch die breitere Streuung der Einzelwerte unscharf. 18 Std, deutlicher 24 Std nach Versuchsbeginn steigt die Kurve wieder langsam an, wobei jedoch der Beginn einer neuen Welle markierter Mitosen nicht sicher bestimmt werden kann.

Aus dem 50%-Wert der Prozent-markierte Mitosen-Kurve lassen sich folgende Parameter des Zellzyklus im Stratum basale der Wangenmucosa bei der erwachsenen Ratte ableiten: G_2 -Phase 1 Std (ob < 1 Std, wurde nicht untersucht); S-Phase 7,5—8 Std; M-Phase ca. 1,5 Std; T_c (= Generationszeit) > 17 Std.

Die Prüfung der Abhängigkeit des ^3H -Indexes von der applizierten Dosis ergibt nahezu konstante Werte (50 μC : 19,2%; 100 μC : 17,2%; 500 μC : 16,5%; 1000 μC : 18,5%), so daß diese Dosierungsbereiche für die Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin verwendet werden können.

Die Bestimmung der SK/ZK an 200 Basalzellen pro Ratte führt bei den allein mit 50 μC und den allein mit 500 μC ^3H -Thymidin markierten Tieren nach einstündiger radioaktiver Versuchszeit zu dem Verteilungsmuster der Abb. 2. Bei 20 SK/ZK als Grenze zwischen stark und schwach markierten Zellkernen ordneten wir von 400 durch 50 μC ^3H -Thymidin markierten Zellkernen 359 als schwach und 41 als stark markiert ein. Bei der Applikation von 500 μC ^3H -Thymidin fanden wir bei einer Grenze von 20 SK/ZK, 358 Kerne stark und 42 schwach markiert.

¹ Einzelheiten der Berechnung bei den Verfassern.

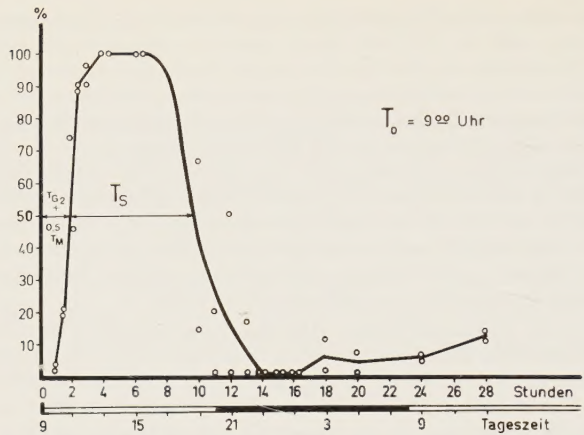


Abb. 1. Darstellung des Prozentsatzes markierter Mitosen im Stratum basale der Wangenschleimhaut der Ratte nach verschiedenen langen radioaktiven Versuchszeiten (500 μ C 3 H-Thymidin i.p. um 9 Uhr. Uhrzeiten auf der Skala unter der Abszisse)

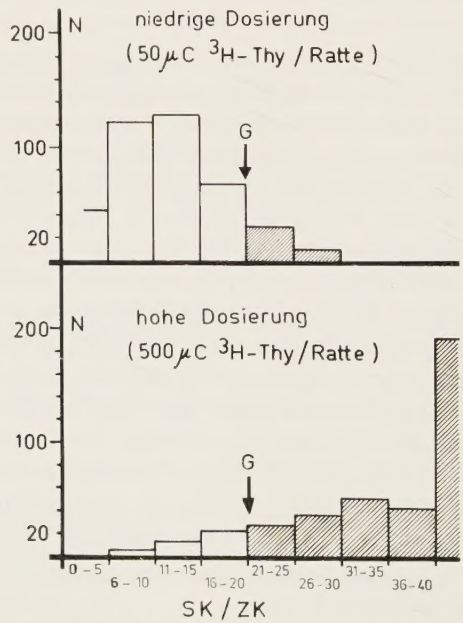


Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der Silberkornzahl/Zellkern (SK/ZK) nach Applikation von 3 H-Thymidin in niedriger und hoher Dosierung. Auszählung an je 200 ZK/Ratte; oben die Summe aus den beiden Tieren mit niedriger Dosis, unten aus den beiden Tieren mit hoher Dosis. *G* Definierte Grenze zwischen schwach und stark markierten Zellkernen. Die stark markierten Anteile beider Kollektive sind schraffiert

Die Auswertung der *doppelt markierten ARG* an mindestens 1000 markierten Zellkernen/Ratte (Gruppe II b) ergab das in Tabelle 1 aufgeführte Zahlenverhältnis aus stark zu schwach markierten Kernen und die daraus errechnete Länge der S. Phase

Tabelle 1. Bestimmung der S-Phasenlänge durch ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung

	Zahlenverhältnis der stark/schwach markierten Zellkerne im ARG	Rechnerisch korrigiertes Zahlenverhältnis	S-Phasenlänge in Stunden
Ratte Nr. 1	809/198	890,58/116,42	7,65
Ratte Nr. 2	823/177	909,23/90,77	10

Diskussion

Die Untersuchung des Prozentsatzes markierter Mitosen nach verschiedenen langer radioaktiver Versuchszeit zeigt die ersten markierten Mitosen 1 Std nach der Applikation des ^3H -Thymidins, was einer G_2 -Phase von maximal 1 Std entspricht (s. Abb. 1). Der nachfolgende schnelle Anstieg markierter Mitosen und das Erreichen des 100%-Wertes sprechen dafür, daß die Häufigkeitsverteilung der S-Phasenlänge relativ eng um einen Mittelwert schwankt (Mendelsohn und Takahashi, 1971). Allerdings weist der flacher verlaufende Abfall der Kurve auf geringe Schwankungen in der Länge der S-Phase bei einzelnen Basalzellen hin. Im Hinblick auf die methodischen Grenzen dieses Untersuchungsverfahrens muß aber darauf hingewiesen werden, daß der absteigende Schenkel der Kurve wegen der Tag-Nacht-Periodik in der Höhe des Mitose-Indexes (Schell *et al.*, 1974) mit geringerer Sicherheit zu bestimmen ist als der aufsteigende Schenkel.

Aus der 50%-Breite der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve ergibt sich eine mittlere S-Phasenlänge von 7,5—8 Std. Vergleichbare Angaben über die S-Phasenlänge im Epithel der Wangenschleimhaut der Ratte liegen bisher nicht vor; unser Wert stimmt aber gut mit den in der Literatur mitgeteilten Daten über die S-Phasenlänge im Mundepithel der Maus und im Zungenepithel der Ratte überein (s. Tabelle 2). Nach 18 bzw. 20 Std findet sich ein Wiederanstieg der Kurve, der allerdings auffallend flach verläuft. Daher ist es nicht sicher, ob dieses Wiederanstiegen als Zeitspanne zwischen den Fußpunkten der 1. und der 2. Mitosewelle einen Hinweis auf die Generationszeit bietet ($T_c > 17$ Std). Der flache Verlauf läßt eher auf eine breite Streuung der Generationszeiten in den Basalzellen schließen.

Die Bestimmung der SK/ZK nach einmaliger Applikation von 50 μC bzw. 500 μC ^3H -Thymidin ergab deutliche Markierungsunterschiede bei beiden Dosierungen, wobei aber in einem engen Bereich eine Überschneidung der Markierungsintensitäten registriert wurde. Diese Überschneidung weist ebenfalls auf individuelle Schwankungen der Länge der S-Phase innerhalb der untersuchten Zellpopulation hin und beeinträchtigt möglicherweise die Anwendbarkeit der DNS-Doppelmarkierung zur Bestimmung der S-Phasenlänge.

Mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung bestimmten wir die S-Phasenlänge beim einen Versuchstier mit $\sim 7,6$ Std, beim anderen mit ~ 10 Std. Die Grenzen dieses Verfahrens liegen darin, daß es wegen der Überschneidung der SK/ZK in den beiden Dosierungsbereichen nicht immer möglich ist, eine Kernmarkierung einem bestimmten Dosisbereich sicher zuzuordnen, so daß eine rechnerische Korrektur unter Berücksichtigung von an anderen Tieren des gleichen Kollektivs ermittelten Ergebnissen erforderlich wird. Zudem ist es bei den unten diskutierten

Tabelle 2. S-Phasenlänge im oralen Epithel von Maus und Ratte

Tier	Gewebe	Dauer der S-Phase in vivo	Autor
Maus	Zunge	10,0	Toto und Ojha (1962)
Maus	Wange		
	Zunge		
	Gaumen	8,0	Toto und Dhawan (1966)
Maus	Wange	7,2	
	Zunge	7,0	Cameron und Greulich (1963)
Maus	Zunge	7,3	Pilgrim und Maurer (1965)
Ratte	Zunge	7,7	Pilgrim und Maurer (1965)
Ratte (Fetus)	Zunge	5,6	Wegener, Hollweg und Maurer (1964)

schen Auswertung schwierig, die relative Anzahl der schwach markierten Zellkerne sicher zu bestimmen, da es z.B. leichter möglich ist, einen schwach markierten als einen stark markierten Kern zu übersehen. Ferner kann die Markierung eines Kernes so schwach sein, daß sie die Grenze zum Nulleffekt unterschreitet und damit der Auswertung entgeht. Rechnerisch wirkt sich aber die Zahl der schwach markierten Zellkerne bei der Bestimmung der S-Phasenlänge besonders stark aus.

Wegener *et al.* (1964) kamen bei der vergleichenden Anwendung des %-markierte-Mitosen-Verfahrens und der Doppelmarkierung mit ³H-Thymidin bei verschiedenen Zellarten der *fetalen Ratte* zu identischen Werten der S-Phasenlänge. Wir fanden bei unseren Untersuchungen mit den beiden Verfahren an der Wangenschleimhaut der *erwachsenen Ratte* unterschiedliche Werte. Die Konstanz der Ergebnisse von Wegener *et al.* (1964) wird dadurch erklärbar, daß bei fetalen Ratten anscheinend keine größeren Schwankungen von T_s um einen mittleren Wert vorkommen und daß also bei diesen Tieren die Doppelmarkierung mit ³H-Thymidin besser als bei erwachsenen Ratten anwendbar ist.

Zusammenfassend zeigt sich, daß bei der erwachsenen Ratte das %-markierte-Mitosen-Verfahren besser zur Bestimmung der mittleren S-Phasenlänge im Stratum basale der Wangenschleimhaut geeignet ist als die Doppelmarkierung mit ³H-Thymidin. Die dargelegte Problematik der Doppelmarkierung in vivo macht es ratsam, die Anwendbarkeit dieses Verfahrens zur Bestimmung der Länge der S-Phase am inkubierten epidermalen Gewebe vergleichend zu prüfen.

Wir danken Frau E. Teubner und Frau H. Albers für ihre technische Unterstützung.

Literatur

Cameron, J. L., Greulich, R. C.: Evidence for an essentially constant duration of DNA-synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. *J. Cell Biol.* **18**, 31—40 (1963)
Mendelsohn, M. L., Takahashi, M.: A critical evaluation of the fraction of labeled mitoses method as applied to the analysis of tumor and other cell cycles. In: *The cell cycle and cancer* (ed. P. Rastetter), p. 58—95. New York: Marcel Dekker Inc. 1971

- Pilgrim, Ch., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung über die Konstanz der DNS-Verdopplungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin. *Exp. Cell Res.* **37**, 183—199 (1965)
- Quastler, H., Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420—438 (1959)
- Schell, H., Schmid, G. H.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyproteronacetat auf die epidermale Proliferation der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.* **248**, 89—98 (1973)
- Schell, H., Schmid, G. H., Hornstein, O. P., Zeissler, H. J.: Untersuchungen über die Tagesperiodik des ^3H -Indexes im Epithel der Wangenschleimhaut und der Rückenepidermis der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.* **250**, 253—260 (1974)
- Schmid, G. H., Hornstein, O. P.: Autoradiographische in-vitro-Untersuchungen über den Einfluß der Inkubationsdauer auf die DNA-Synthese psoriatischer Epidermiszellen von Stanzbiopsien im Glutamin-freien Nährmedium. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* **15**, 165—176 (1974)
- Schmid, G. H., Hornstein, O. P., Popp, E.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese in der Wangenschleimhaut und im Zungenepithel verschieden alter Ratten. *Arch. Derm. Forsch.* **246**, 236—248 (1973)
- Toto, P. D., Dhawan, A. S.: Generation cycle of oral epithelium in 400-day-old mice. *J. dent. Res.* **45**, 948—950 (1966)
- Toto, P. D., Ojha, G.: Generation cycle of oral epithelium in mice. *J. dent. Res.* **41**, 388—391 (1962)
- Wegener, K., Hollweg, S., Maurer, W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer Teil-Phasen des Zellzyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. *Z. Zellforsch.* **63**, 309—326 (1964)

Prof. Dr. O. P. Hornstein
Dr. G. H. Schmid
Dr. H. Schell
Dermatologische Univ.-Klinik Erlangen
D-8520 Erlangen
Hartmannstr. 14
Bundesrepublik Deutschland



Untersuchungen über die Tagesperiodik des ^3H -Indexes im Epithel der Wangenschleimhaut und in der Rückenepidermis der männlichen Ratte*

H. Schell, G. H. Schmid, O. P. Hornstein und H. J. Zeissler

Dermatologische Universitätsklinik mit Poliklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. O. P. Hornstein) (BRD)

Eingegangen am 18. März 1974

Autoradiographic Investigations on the Diurnal Fluctuations of the Labelling Index in Oral and Dorsal Epithelium of the Male Rat

Summary. In 10 adult male rats (Sprague-Dawley) we studied the diurnal fluctuations of the percentage of DNA-synthesizing nuclei (LI) in the basal cell layer of the buccal mucosa as well as in the dorsal interfollicular epidermis. Additionally the mitotic index (M.I.) in the oral epithelium of the same animals was recorded. In both epithelia we found high values of the LI at night (at 3 a.m.) and in the morning time (at 9 a.m.), low values on the other hand during the day and evening (at 15 and 21 p.m.). The different levels of labelling index obviously represent an endogenous diurnal rhythm being synchronized in both epithelia. The MI in oral epithelium also fluctuated diurnally. However, minima and maxima of the MI-curve occurred later in the 24 hr period than those of the LI-curve.

Zusammenfassung. An 10 erwachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden die tageszeitlichen Schwankungen des ^3H -Indexes in der schnell proliferierenden Wangenschleimhaut und in der langsamer proliferierenden Rückenepidermis bestimmt, an der Wangenschleimhaut zusätzlich der Mitoseindex. Es zeigte sich, daß die Werte des ^3H -Indexes in beiden Geweben in den Nachtstunden (3 Uhr) und am Morgen (9 Uhr) gegenüber den Tages- und Abendwerten (15 und 21 Uhr) stark erhöht sind und daß die tageszeitlichen Proliferationsschwankungen in beiden Geweben zeitlich parallel verlaufen. Auch der Mitoseindex in der Wangenschleimhaut zeigte tagesperiodische Schwankungen, wobei die Minima und Maxima zeitlich später auftraten als die Minimal- und Maximalwerte des ^3H -Indexes. Die Bedeutung der Befunde wird diskutiert und mit den in der Literatur vorliegenden Befunden verglichen.

Bereits 1926 berichtete Fortuin van Leyden über ein gehäuftes Auftreten von Mitosen zu bestimmten Tages- und Nachtzeiten bei der Maus, ein Befund, der von anderen Untersuchern an verschiedenen epithelialen und mesenchymalen Geweben der Maus und der Ratte später bestätigt

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 118.

wurde (Bullough, 1948; Halberg *et al.*, 1953; Markelova, 1962; Pilgrim *et al.*, 1963, 1965; Alov, 1963; Evensen, 1963; Scheving u. Pauly, 1967; Hansen, 1966, 1967; Tvermyr, 1969). Daß auch der ^3H -Index (= Prozentsatz ^3H -Thymidin-markierter Zellkerne einer Zellpopulation nach einstündiger radioaktiver Versuchszeit) einer Tagesperiodik unterliegt, konnte an der Maus gezeigt werden (Pilgrim *et al.*, 1963; 1965; Kirschner, 1968). Dagegen finden wir in der Literatur kaum Hinweise auf eine Tagesperiodik in epidermalen Geweben der Ratte (Messier u. Leblond, 1960). Da zudem die Ergebnisse über tagesperiodische Proliferationsabläufe wegen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht einheitlich sind, prüften wir bei der männlichen Ratte die Schwankungen des ^3H -Indexes und des Mitose-Indexes (= Prozentsatz von Mitosen in einer Zellpopulation) an der schnell proliferierenden Wangenschleimhaut und verglichen die Befunde mit dem ^3H -Index in der langsamer proliferierenden Rückenhaul der gleichen Tiere. Diese chronobiologischen Experimente sollen frühere Untersuchungen über den Einfluß des Alters und der hormonellen Regulation auf die Höhe des ^3H -Indexes in der Wangenschleimhaut und Rückenepidermis der Ratte ergänzen (Schmid *et al.*, 1973; Schell u. Schmid, 1973; Schell *et al.*, 1974).

Material und Methode

Wir untersuchten 10 männliche, 4 Monate alte, durchschnittlich 380 g schwere Sprague-Dawley-Ratten einer Zucht. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 4 Wochen lang den konstanten Bedingungen unseres Labors ausgesetzt (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Std: 8–20 Uhr hell, 20–8 Uhr dunkel; Raumtemperatur 21°C ; Hartfutter und Wasser *ad lib.*). Die Versuche wurden im Juni 1973 durchgeführt. Es wurden jeweils 5 Tiere in einem Käfig gehalten. Zu den nachfolgend genannten Versuchszeiten erhielten die Tiere je $500\text{ }\mu\text{C}$ ^3H -Thymidin (spez. Akt. $6,0\text{ C/mMol}$; Schwarz Bio Research, N.Y.) i.p. appliziert: 8 Uhr–3 Tiere, 14 und 20 Uhr–je 2 Tiere, 2 Uhr–3 Tiere. Jeweils 1 Std später wurden die Tiere durch Dekapitation im Ätherrausch getötet. Fixierung der entnommenen Gewebe in Thymidin-Formalin, weitere Aufarbeitung zur Paraffineinbettung, Anfertigung von $3\text{ }\mu$ dicken Gewebeschnitten (senkrecht zur Oberfläche der Rückenepidermis und der Wangenschleimhaut) und von Autoradiogrammen mit dem Stripping-Film AR 10 (Kodak). Expositionszeit 18 Tage, abschließend Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin.

Zur Bestimmung des ^3H -Indexes wurden bei jedem Tier im interfollikulären Epithel der Rückenhaul 2000 und in der Wangenschleimhaut 4000 Zellen der basalen Zellreihe gezählt. Die Mittelwerte der ^3H -Indices ergeben sich aus den Einzelwerten jedes Versuchszeitpunktes. Bei der Auswertung der Autoradiogramme fiel auf, daß eines der beiden um 15 Uhr getöteten Tiere keine Kernmarkierung aufwies. Da auch in Referenzorganen, deren hohe Proliferationsrate bekannt ist (z. B. Dünndarm) keine Kernmarkierung feststellbar war, muß angenommen werden, daß dieses Tier keine Radioaktivität erhalten hatte. Es wurde daher bei der Beurteilung der Autoradiogramme ausgesondert.

Zur Bestimmung des Mitose-Indexes zählten wir an der Wangenschleimhaut jeweils 2000 Basalzellen pro Tier, wobei die Zellteilungsfiguren von der Prophase bis zur Telophase in die Zählung einbezogen wurden.

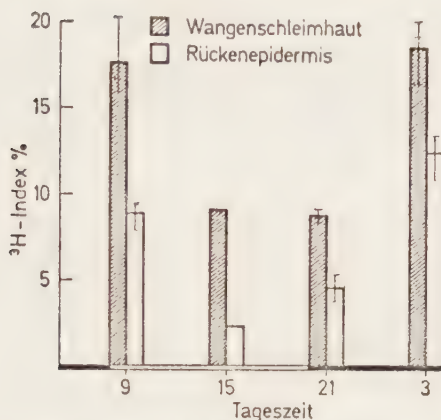


Abb. 1. Vergleichende Darstellung des ^3H -Indexes in der Wangenschleimhaut und in der Rückenepidermis der Ratte zu verschiedenen Tageszeiten (die Hell-Dunkel-periode ist in der Abszisse dargestellt)

Ergebnisse

Im Stratum basale der *Wangenschleimhaut* und der *Rückenepidermis* fanden sich im 24 Std.-Verlauf zu den Zeitpunkten 9 Uhr, 15 Uhr, 21 Uhr und 3 Uhr deutliche Schwankungen in der Höhe des ^3H -Indexes (Abb. 1). In beiden Geweben verliefen diese Schwankungen zeitlich parallel mit höchsten Werten nachts um 3 Uhr und morgens um 9 Uhr. Dabei waren die nächtlichen Maximalwerte in der Rückenepidermis etwa 5 mal höher als die niedrigsten Tageswerte (um 3 Uhr 12,5%, um 15 Uhr 2,35%); in der Wangenschleimhaut unterschieden sich die entsprechenden Werte etwa um den Faktor 2 (um 3 Uhr 18,6%, um 21 Uhr 8,8%).

Auch der in der Wangenschleimhaut an 2000 Basalzellen/Tier bestimmte Mitose-Index zeigte tagesperiodische Schwankungen, deren Minimal- und Maximalwerte jeweils zeitlich später auftraten als die Minimal- und Maximalwerte der ^3H -Indices (Abb. 2).

Diskussion

Mitose-Index (MI) und ^3H -Index vermitteln nur „Momentaufnahmen“ von Proliferationsabläufen. Bei Schwankungen im Ablauf der Proliferation wird die Höhe der Einzelergebnisse entscheidend von der Wahl der Versuchszeitpunkte beeinflusst. Deshalb ist es schwierig, die im Schrifttum mitgeteilten Befunde über eine Tagesperiodik des Mitose-Indexes und des ^3H -Indexes miteinander zu vergleichen. Auch werden derartige Schwankungen durch endogene und exogene Einflüsse modifiziert (z. B. Belichtungsdauer, Jahreszeit, Alter, Lebensgewohnheiten der Versuchstiere, Bedingungen der Tierhaltung), deren Wirkung jedoch unterschiedlich beurteilt wird (Bullough, 1949; Bullough u. Laurence,

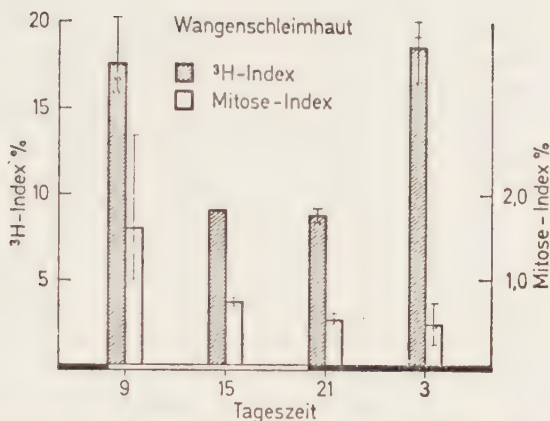


Abb. 2. Darstellung des ^3H -Indexes und des Mitose-Indexes in der Wangenschleimhaut der Ratte zu verschiedenen Tageszeiten (die Hell-Dunkel-Periode ist in der Abszisse dargestellt)

1961, 1966; Pilgrim *et al.*, 1965; Hansen, 1966; Kirschner, 1968; Solem, 1968; Tvermyr, 1969, 1972).

In früheren Mitteilungen berichteten wir über altersabhängige Unterschiede des ^3H -Indexes in diesen Geweben und über den Einfluß von Hormonen auf die epidermale Proliferation (Schmid *et al.*, 1973; Schell u. Schmid, 1973; Schell *et al.*, 1974). Diese Experimente wurden jeweils vormittags zwischen 9 und 11 Uhr ausgeführt, so daß wir die dabei erhaltenen Ergebnisse nunmehr auch im Hinblick auf die endogene Tagesperiodik in der Höhe des ^3H -Indexes überprüfen.

Wir fanden, daß der ^3H -Index im Wangenepithel und in der Rückenepidermis hohe Werte um 3 und 9 Uhr aufwies, während die 15- und 21 Uhr-Werte wesentlich niedriger lagen (Abb. 1). Damit ist auch für epidermale Gewebe der Ratte gezeigt, daß die Anzahl der zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt in der S-Phase angetroffenen Zellen im 24 Std.-Verlauf schwankt. Ähnliche Befunde wurden auch bei der Maus erhoben (Alov, 1963; Pilgrim *et al.*, 1963, 1965; Tvermyr, 1972). Sie unterscheiden sich jedoch dadurch, daß die bei der Maus registrierten hohen Werte des ^3H -Indexes in Mundschleimhaut, Zunge, Oesophagus, Jejunum und Bauchhaut nur bis 3 bzw. 4 Uhr bestehen blieben (Pilgrim *et al.*, 1965; Kirschner, 1968; Sigdestad *et al.*, 1969), während wir an der Ratte hohe Werte des ^3H -Indexes sowohl um 3 Uhr als auch um 9 Uhr beobachteten. Diese zeitliche Verschiebung der Maximalwerte in den Morgen kann speciesbedingt, kann aber auch durch unsere Versuchsbedingungen — z. B. durch den von uns gewählten Hell-Dunkel-Wechsel um 8 Uhr und 20 Uhr — induziert sein.

Bemerkenswert ist die zeitliche Parallelität der über 24 Std. verteilten Schwankungen des ^3H -Indexes in der schnell proliferierenden Wangen-

schleimhaut und in der wesentlich langsamer wachsenden Rückenhaut (Abb. 1). Sie stimmt gut mit den Beobachtungen von Pilgrim *et al.* (1965) überein, die in verschiedenen Epithelien der Maus (z. B. Bauchhaut, Zungen- und Oesophagusepithel) ebenfalls synchrone periodische Schwankungen des ^3H -Indexes fanden. Dies spricht dafür, daß bei der Tagesperiodik des ^3H -Indexes ein *übergordnetes endogenes Regulationsprinzip* von Bedeutung sein dürfte.

Es stellt sich die Frage, ob die periodisch wechselnde Zahl der in der DNS-Synthese angetroffenen Zellkerne durch eine Änderung der S-Phasendauer oder durch eine Änderung der Eintrittsrate von Zellen in die S-Phase zustande kommt, wobei dies durch eine Variation in der Länge der G₁-Phase oder durch eine tagesperiodisch schwankende Zahl von Zellen, die aus der „non-growth-fraction“ in die „growth-fraction“ der Epidermis übertreten, bedingt sein kann.

Pilgrim *et al.* (1965) fanden bei der Maus im Oesophagusepithel und in der Epidermis der Bauchhaut während des 24 Std-Zeitraumes bei schwankendem ^3H -Index gleiche Silberkornzahlen/Zellkern und schlossen daraus, daß die S-Phase konstant bleibt. Tvermyr (1972) dagegen berichtete, daß an der Mäusepidermis tagesperiodische Schwankungen der S-Phasenlänge registrierbar sind (zwischen 7 und 10 Uhr: 5 Std; zwischen 10 und 13 Uhr: 12 Std).

Anhand unseres Materials lassen sich diese proliferationskinetischen Fragen zur Tag-Nachtperiodik nicht eindeutig beantworten. Die mittleren Silberkornzahlen/Zellkern, die wir an der Wangenschleimhaut orientierend an 35 markierten Zellkernen/Tier bestimmten, zeigten innerhalb jedes Untersuchungszeitpunktes große Schwankungen, so daß eine einheitliche Tendenz nicht nachweisbar ist.

Neben dem ^3H -Index bestimmten wir an der Wangenschleimhaut den Mitose-Index, der ebenfalls eine periodische Schwankung aufwies. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Trott u. Gorenstein, 1963; Hansen, 1967) fanden wir ein Maximum des Mitose-Indexes am Morgen (9 Uhr) und Minimalwerte in der Nacht (21 und 3 Uhr) (Abb. 2). Dabei ist der Verlauf des Mitose-Indexes zum 24 Std-Verlauf des ^3H -Indexes zeitlich verschoben, was verständlich ist, da die periodischen Änderungen des ^3H -Indexes den periodischen Verlauf des Mitose-Indexes bestimmen.

Während die durch den ^3H -Index erfaßte S-Phase des Wangenepithels mehrere Stunden dauert — nach eigenen Untersuchungen mittels des ^3H -markierte-Mitosen-Verfahrens 7,5–8 Std (Schmid *et al.*, 1974) —, benötigt die Mitose-Phase nur etwa 60–90 min. Wahrscheinlich befinden sich die zwischen 2 und 3 Uhr DNA-synthetisierenden Zellen vorwiegend in der ersten Hälfte der S-Phase, so daß ihr Übergang in die G₂- und M-Phase erst einige Stunden später erfolgt und somit erst bei der nächsten Zeitmarke (9 Uhr) durch den Gipfel des MI erfaßbar wird. Andererseits ist aus dem auch um 9 Uhr noch hohen ^3H -Index zu schließen, daß der nächtliche Gipfel der S-Phase breit ist. Wahrscheinlich befinden

sich um 9 Uhr mehr Zellen in der späten als in der frühen S-Phase, da um 15 Uhr sowohl der ^3H -Index als auch der Mitose-Index deutlich erniedrigt ist.

Erwähnt sei in diesem Zusammenhang, daß Mühlemann *et al.* (1955) das Mitose-Maximum im oralen Epithel der Ratte um 7 Uhr fanden, während der Mitosegipfel für die Rattenepidermis von Blumenfeld (1939) um 9 Uhr, von Scheving u. Pauly (1960) dagegen um 3 Uhr festgestellt wurde. Auch gibt es Tagesrhythmen der Kerngröße (von Leberzellen) mit einer Zunahme des Kernvolumens zwischen 3 und 7 Uhr und einer Verkleinerung zwischen 11 und 15 Uhr (Hardeland *et al.*, 1973).

Durch die unterschiedliche Länge der S- und M-Phase wird bei dem 6 stündigen Zeitintervall unserer Versuche also eine „asymmetrische“ Verteilung des MI vorgetäuscht, die auch bereits Pilgrim *et al.* (1965) am Mäuse-Epithel aufgefallen war. Möglicherweise ließe sich durch ein noch engeres „Zeitraster“, d. h. durch zeitlich dichter aufeinanderfolgende Untersuchungstermine (z. B. mit 3 Std. statt 6 Std-Intervallen) die Tag-Nachtperiodik des ^3H -Indexes und des Mitose-Indexes noch genauer präzisieren.

Die tagesperiodischen Änderungen in der Höhe des ^3H -Indexes müssen bereits mehrere Stunden vor den registrierten Schwankungen durch ein übergeordnetes, rhythmisierendes Regulationszentrum ausgelöst werden, da die S-Phase Stunden vor ihrem Beginn durch — im Experiment störbare — Stoffwechselvorgänge eingeleitet wird (Literatur s. Duspiva, 1971). Wie eigene Experimente am Samenblasenepithel der kastrierten Ratte zeigten, dauert diese präparative Phase unter exogener Testosteron-Stimulation etwa 12–24 Std (Schmid *et al.*, 1973). Neben dem hypothetischen Steuerungszentrum („Physiologische Uhr“ nach Bünning, 1963) könnten humorale Faktoren, die die Zellteilung hemmen (Bullough, 1962; Evensen, 1964; Laurence u. Hansen, 1971; Elgjo u. Edgell, 1973) oder fördern (Hell, 1970), für Schwankungen der Proliferationsabläufe von Bedeutung sein. Zusammenhänge mit der Chalone-wirkung und dem Adrenalin Spiegel des Blutes wurden nachgewiesen (Bullough u. Laurence, 1964, 1966; Evensen, 1964). Neuerdings wird diskutiert, daß das cyclische AMP, bzw. die Adenylecyclase, die die Bildung von cyclischem AMP aus ATP induziert, und Chalone identisch sind (Voorhees, 1970; Williams, 1972), so daß eine periodische Induktion der Wirkung des cAMP durch Adrenalin die tagesperiodischen Schwankungen des ^3H -Indexes hervorrufen könnte.

Damit bleiben die periodischen Schwankungen im Proliferationsablauf der von uns untersuchten epidermalen Gewebe der Ratte in den periodischen Ablauf zahlreicher anderer biologischer Phänomene integriert (vgl. v. Mayersbach, 1967; Bünning, 1967; Rensing, 1969, 1973). Sie machen deutlich, daß bei der Beurteilung proliferationskinetischer Untersuchungen auch chronobiologische Faktoren zu berücksichtigen sind.

Wir danken Frau E. Teubner und Frau H. Albers für ihre technische Hilfe.

Literatur

- Aloy, I. A.: Daily rhythm of mitosis and relationship between cell work and cell division. *Fed. Proc.* **22** (Transl. Suppl.), 357–362 (1963)
- Blumenfeld, C. M.: Periodic mitotic activity in the epidermis of the albion rat. *Science* **90**, 446–447 (1939)
- Bünning, E.: *Die physiologische Uhr*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963
- Bullough, W. S.: Mitotic activity in the male mouse. *Proc. roy. Soc. B* **135**, 212–233 (1948)
- Bullough, W. S.: Age and mitotic activity in the male mouse. *J. exp. Biol.* **26**, 261–286 (1949)
- Bullough, W. S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* **37**, 307–342 (1962)
- Bullough, W. S., Laurence, E. B.: Stress and adrenaline in relation to the diurnal cycle of epidermal mitotic activity in adult male mice. *Proc. roy. Soc. B* **154**, 540–556 (1961)
- Bullough, W. S., Laurence, E. B.: Mitotic control by internal secretion: the role of the chalone-adrenalin complex. *Exp. Cell Res.* **33**, 176–194 (1964)
- Bullough, W. S., Laurence, E. B.: The diurnal cycle in epidermal mitotic duration and its relation to chalone and adrenalin. *Exp. Cell Res.* **44**, 343–350 (1966)
- Duspiva, E.: *Biochemie der Mitose*. Hbd. allg. Pathol. (Hrg. F. Büchner, E. Letterer (F. Roulet)). Bd. II/2/I, pp. 480–568. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971
- Elgjo, K., Edgchill, W.: Epidermal growth inhibitors (chalones) in dermis and serum. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **13**, 14–23 (1973)
- Evensen, A.: Kinetics of epidermal cell proliferation in experimental skin carcinogenesis. *Bull. Wld Hlth Org.* **28**, 513–515 (1963)
- Evensen, A.: The effect of adrenalin on the mitotic rate in the epidermis of hairless mice. *Acta path. microbiol. scand.* **61**, 55–59 (1964)
- Fortuin van Leyden, C. E. D.: Day and night period in nuclear divisions? *Proc. Kon. ned. Akad. Wet.* **29**, 979–988 (1926)
- Hallberg, F., Visscher, M. B., Bittner, J. J.: Eosinophil rhythm in mice: range of occurrence, effects of illumination, feeding and adrenalectomy. *Amer. J. Physiol.* **174**, 109–122 (1953)
- Hansen, R. E.: Mitotic activity in the oral epithelium of the rat. Variations according to age and time of the day. *Odont. T.* **74**, 196–201 (1966)
- Hansen, R. E.: Mitotic activity in tongue and gingival epithelium of adrenalectomized rats. *Odont. T.* **75**, 467–472 (1967)
- Hardeland, R., Hohnmann, D., Rensing, L.: zit. n. Rensing (1973). *J. interdisciple. Cycle Res.* (1973)
- Hell, E.: A stimulant to DNS synthesis in guinea-pig ear epidermis. *Brit. J. Derm.* **83**, 632–636 (1970)
- Kirschner, H.: *Autoradiographische Untersuchung über die Regeneration der Mundschleimhaut*. Habil.-Schrift, Gießen 1968
- Laurence, E. B., Hansen, R. E.: An in vivo study of epidermal chalone and stress hormones on mitosis in tongue epithelium and ear epidermis of the mouse. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* **9**, 271–279 (1971)
- v. Mayersbach, H.: *The cellular aspects of biorhythms*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Markelova, I. V.: The 24-hr rhythm of the mitotic activity of exocrine epithelium of rat pancreas. *Bull. exp. Biol. Med.* **53**, 74–77 (1962)
- Messier, B., Leblond, C. B.: Cell proliferation and migration as revealed by autoradiography after injections of thymidine- ^3H into male rats and mice. *Amer. J. Anat.* **106**, 247–285 (1960)
- Mühlemann, H. R., Marthaler, T. H., Loustalot, P.: zit. nach Rensing (1969). *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **90**, 467 (1955)

- Pilgrim, C., Erb, W., Maurer, W.: Diurnal fluctuations in the numbers of DNA-synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature (Lond.)* 4896, 863 (1963)
- Pilgrim, Ch., Lennartz, K. J., Wegener, K., Hollweg, S., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung über tageszeitliche Schwankungen des H-3-Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Rattenfetus sowie bei Ascites-Tumorzellen. *Z. Zellforsch.* 68, 138—154 (1965)
- Rensing, L.: Tagesperiodik von Zellfunktionen und Strahlenempfindlichkeit in Normal- und Tumorgewebe. *Naturwiss. Rdsch.* 22, 390—396 (1969)
- Rensing, L.: Biologische Rhythmen und Regulation. Stuttgart: G. Fischer 1973
- Schell, H., Schmid, G. H.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyproteronacetat auf die epidermale Proliferation der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.* 248, 89—98 (1973)
- Schell, H., Schmid, G. H., Hornstein, O. P.: Autoradiographic investigations on DNA synthesis in the dorsal epidermis of rats at different ages. *Arch. Derm. Forsch.* 249, 291—300 (1974)
- Scheving, L. E., Pauly, J. E.: Effect of adrenalectomy, adrenal medullectomy and hypophysectomy on the daily mitotic rhythm in the corneal epithelium of the rat. In: *The cellular aspects of biorhythms* (Ed. H. v. Mayersbach), pp. 167—174. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Scheving, L. E., Pauly, J. E.: Daily mitotic fluctuations in the epidermis of rat and their relation to variations in spontaneous activity and rectal temperature. *Acta anat. (Basel)* 43, 337—345 (1960)
- Schmid, G. H., Hornstein, O. P., Popp, E.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese in der Wangenschleimhaut und im Zungenepithel verschieden alter Ratten. *Arch. Derm. Forsch.* 246, 236—248 (1973)
- Schmid, G. H., Schell, H., Heyder, N.: Proliferationskinetische Untersuchungen über den Einfluß von Testosteronpropionat auf das Samenblasenepithel der kastrierten Ratte. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* 15, 65—74 (1973)
- Schmid, G. H., Schell, H., Hornstein, O. P., Meisel, H. U., Zeissler, H. J.: Studies on the duration of the nuclear DNA-synthesis in buccal mucosa of male adult rats. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* (in press) (1974)
- Sigdestad, C. P., Baumann, J., Leshner, S. W.: Diurnal fluctuations in the number of cells in mitosis and DNA synthesis in the jejunum of the mouse. *Exp. Cell. Res.* 58, 159—162 (1969)
- Solem, J. H.: Mus i bur, Noen forhold vedrørende atferd og binyrebarkfunksjon. *T. norske Laegeforen.* 88, 311—314 (1968)
- Trott, J. R., Gorenstein, S. L.: Mitotic rates in the oral and gingival epithelium of the rat. *Arch. oral Biol.* 8, 425—434 (1963)
- Tvermyr, E. M. F.: Circadian rhythms in epidermal mitotic activity. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* 2, 318—325 (1969)
- Tvermyr, E. M. F.: Circadian rhythms in hairless mouse epidermal DNA-synthesis as measured by double labelling with H3-Thymidine. *Virchows Arch., Abt. B, Zellpath.* 11, 43—54 (1972)
- Voorhees, J.: Quoted in editorial, Yearbook of Dermatology (Eds. A. W. Kopf and R. Andrade), p. 210. Chicago: Year Book Med. Publ. 1970
- Williams, J. P. G.: Glycogen and cell division in the epidermis; reported at meeting for Society of Experimental Biology, London 1972

Dr. H. Schell
 Dr. G. H. Schmid
 Prof. Dr. O. P. Hornstein
 Dermatologische Universitäts-Klinik
 D-8520 Erlangen, Hartmannstraße 14
 Bundesrepublik Deutschland

LEBENS LAUF

Am 3. August 1950 wurde ich als 5. Kind der Landwirts-Eheleute Hans und Elisabeth Zeißler, geb. Ziegler, in Ebermannstadt, Kreis Forchheim, geboren.

Im Herbst 1956 trat ich in die Volksschule in Pretzfeld ein. Nach 4 Jahren wechselte ich an das Gymnasium Forchheim über, das ich bis zum Abitur im Jahre 1969 besuchte.

Im Wintersemester 1969 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zum Studium an der Phil. Fakultät. Das Studium der Medizin begann ich im Sommersemester 1970. Im Frühjahr 1976 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.

Erlangen, im Februar 1976

Hans-Jürgen Zeißler

